

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-192171

(43)Date of publication of application : 03.08.1993

(51)Int.Cl.

C12N 15/89
C12M 1/00

(21)Application number : 03-199082

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 08.08.1991

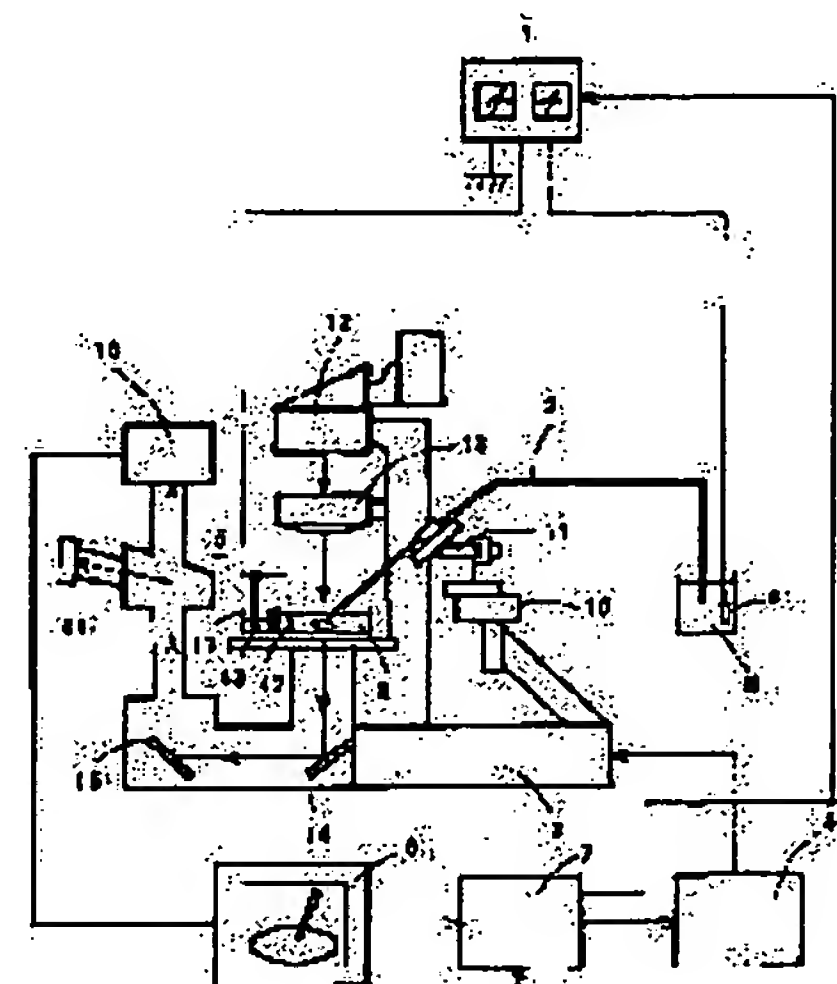
(72)Inventor : KAMAHORI MASAO
HARADA YOSHINORI

(54) MICROINJECTION METHOD AND ITS APPARATUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable to inject a micro amount of samples such as DNA, etc., into a cell in good accuracy.

CONSTITUTION: The objective apparatus consists of an electrophoresis unit 2 injecting a sample into a cell by electrophoresis, an electric source 1 impressing a high voltage on the electrophoresis unit 2, a drive unit 3 consisting of a coarse moving part 10 having a large moving range and a slight moving part 11 for a micro area to drive a tip of the electrophoresis unit 2, a controller 4 controlling motions of the drive unit 3 in x, y and z directions, a microscope 5 having a television camera, a television monitor 6 projecting a microscope image enlarged by the microscope 5 and a computer 7 inputting an information from the television monitor 6, moving the tip of the electrophoresis part 2 to a designated position in the television monitor 6 and outputting an injection order in the controller 4. By using electrophoresis for injecting a sample into a cell and controlling an impressed voltage and time of the voltage impression, a micro amount of the sample can be injected in good accuracy.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-192171

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C 1 2 N 15/89

C 1 2 M 1/00

A 9050-4B

8931-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 5 頁)

(21)出題番号

特願平3-199082

(22)出題日

平成3年(1991)8月8日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 釜堀 政男

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 原田 義則

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 マイクロインジェクション法及びその装置

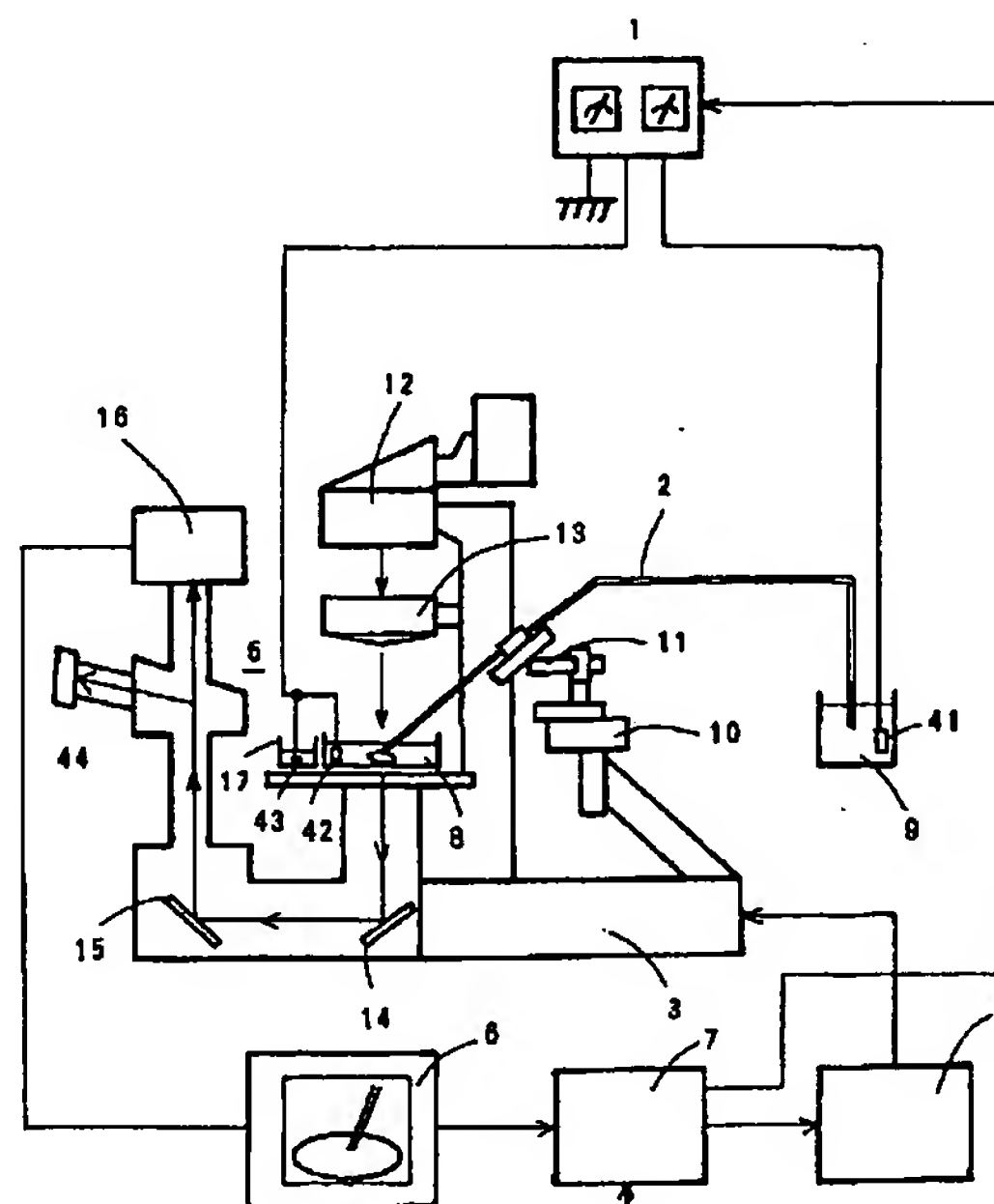
(57)【要約】

【目的】細胞内に極微量のDNA等の試料を精度良く注入すること。

【構成】細胞内に試料を電気泳動で注入する電気泳動部2、電気泳動部2に高電圧を印加する電源部1、電気泳動部2の先端部を駆動させる移動距離の大きい粗動部10と微小領域用の微動部11からなる駆動部3、駆動部3のxyz方向の動作を制御するコントローラ部4、テレビカメラを有する顕微鏡部5、顕微鏡部5により拡大された顕微鏡像を映しだすテレビモニタ部6、及びテレビモニタ部6の情報を入力し、電気泳動部2の先端部をテレビモニタ部6の指定位置に移動、注入の命令をコントローラ部4に出力する計算機部7から構成されている。

【効果】細胞内への試料の注入に電気泳動法を用いることにより、印加電圧及び電圧印加時間を制御することにより、極めて微量の試料量を精度良く注入することができる。

1



い注入精度を得ることができるが、さらに高精度の注入精度が要求される場合や極微量の溶液の細胞内への流入が必要になる場合には、電極間に導電性の隔壁を設けることもできる。電極間の導電性隔壁の説明を図5に示す。電気泳動用のキャピラリー21の間に数十 μ mのピンホール26を有するガラス板27を設置している。キャピラリー21の両端に電源部1により電圧を印加すると、低分子のイオン28が移動する。その際、低分子のイオン28はピンホール26を通り抜けることができるため電流が流れ、電気泳動が行なわれる。しかし、電気浸透流による溶液の移動は、ピンホール26の負荷のために妨げられる。そのため、ピンホールを有するガラスを用いることにより、導電性は維持され電気泳動は行なわれるが、電気浸透流による溶液の細胞内への流入を抑えることができる。さらに、ガラスキャピラリーの一端が導電性隔壁により閉じているため、ガラスキャピラリー先端の減圧も抑えられて、細胞外液や空気のガラスキャピラリー内への吸引も減少し、注入試料量の精度を著しく向上することができる。隔壁はガラス板27に限らず、例えば、焼結フィルタとして知られる微小な連通孔を有するものが使用可能である。要するに、流体の移動には障害になり、電気的には導通するものであれば良いのである。

【0006】

【実施例】以下、本発明の一実施例をブロック図で示す図1により説明する。

【0007】マイクロインジェクタは、電源部1、電気泳動部2、駆動部3、駆動部3を制御するコントローラ部4、顕微鏡部5、テレビモニタ部6、及びテレビモニタ部6の情報をコントローラ部4に出力する計算機部7から構成されている。電源部1は、出力電圧0-30kVで、極性切り替えが容易な高電圧電源を使用し、試料槽8とバッファ槽9との間に電極41、42を使用して、および試料槽8に並設された試料容器17とバッファ槽9との間に電極41、43を使用して電圧を印加している。いずれに電圧を印加するかによって極性が逆になるように決定される。電気泳動部2は、 $\phi 1.0$ mmの熔融石英ガラス管を引き延ばし器（例えば、微小電極製作器、成茂PN-3）を用いて、熱と電磁場による伸長力により引き延ばし、先端が $\phi 1.0\mu$ mとしたガラスキャピラリーを用いた。高い注入精度または電気浸透流による細胞内への溶液の流入を抑えたい場合には、電気泳動部2の中間、すなわち試料槽8とバッファ槽9の間に導電性の隔壁を設けることもできる。駆動部3は、パルスモーター駆動の移動距離の大きい粗動部10と駆動分解能が数10 μ mのピエゾ素子で駆動する微小領域用の微動部11から構成され、xyz方向の動きをコントロールしている。なお、微動部11は、最小駆動距離が1.0 μ m程度の場合には油圧式マイクロマニピュレータを使用することもできる。コントローラ部

4は、駆動部3によるxyz方向の動作を制御するもので、試料吸引等の汎用の動作は、xyz方向の移動距離、及び停止時間をプログラム化することでスイッチ一つで行なうことができる。顕微鏡部5では、照明用の光源12からの光がコンデンサレンズ13を介して試料槽8を照らしており、試料槽中の試料は反射ミラー14、15を介してテレビカメラ16で撮像される。細胞内への試料の注入操作は、テレビモニタ部6に映し出された細胞をライトペン等により指定することにより、指定されたその位置は計算機部7に位置情報として入力され、計算機部7からコントローラ部4へその位置情報をもとにした移動情報を出力し、その位置情報によりコントローラ部4は駆動部3をコントロールする。そのため、テレビモニタ部6に映し出された細胞をライトペン等により指定することにより、自動的に試料の注入が行なわれる。また、テレビモニタ部6または顕微鏡部5のファインダ44を見ながら、操作者が計算機部7を介してコントローラ部4へ位置情報を与え、これをもとにした移動情報を出力してコントローラ部を制御することにより、手動で試料の注入を行なうこともできる。

【0008】細胞内への試料の注入は、まず、電気泳動部2のガラスキャピラリー先端を試料容器17に移動させて、電源部1により電極41、43に所定の極性の電圧を印加することにより、顕微鏡部5内に設置された試料容器17内の試料を電気泳動部2のガラスキャピラリー先端から電気泳動で一定試料量吸引した。なお、吸引する試料量は、ピコグラムオーダーでも印加電圧及び電圧印加時間により、容易に決めることができる。次に、電気泳動部2のガラスキャピラリー先端を試料槽8に移動させることになるが、これはテレビモニタ部6に映し出された細胞の特定部分をライトペンにより指定することにより、計算機部7からコントローラ部4へその位置情報を与えて自動的に電気泳動部2の先端を細胞の特定部分に移動した。その後、電源部1の極性を切り替えて、電極41、42に所定の電圧を印加し、細胞内への試料の導入を電気泳動で行なった。なお、試料注入量は、印加電圧及び電圧印加時間により決めることができる。また、上記操作を手動で行なう場合には、モニター画面6又はファインダ44を見ながら、計算機部7からコントローラ部4へ信号を与え、電気泳動部2の先端を粗動部10を用いて大まかな位置決めを迅速に行ない、その後微動部11を用いて、細胞の特定部分に位置決めした。その後、電源部1の極性を切り替えて、電極41、42に所定の電圧を印加し、細胞内への試料の導入を電気泳動で行なった。

【0009】次に、本発明の実施例で必要により、電気浸透流を除去する場合を図2により説明する。

【0010】先にも述べたように、電気浸透流を除去するためには、流体の移動には抵抗になり、電気的には導通する導電性隔壁を電気泳動部2に設ける。その他の構

成は図1と同じで良い。導電性隔壁32は、ピンホールを有するボラスガラス板（コーニング社製）を使用した。ガラスキャピラリー31は導電性隔壁32を挟んだ形で配置され、この部分が漏れ防止用テフロンシール33により密着されてる。テフロンシール33は上下に2分割されており、夫々が、同様に2分割されたホルダー34に保持される。二つのホルダー34にはシリンダー35、ピストン36およびバネ37と外箱50とにより上下に押す力が作用させられている。及び加圧機35から構成されている。

【0011】なお、この隔壁部は、電気浸透流があっても支障が無いとき或はこれを利用したいときは下側ホルダーを押し下げて導電性隔壁32を取りはずし、その後ガラスキャピラリー31をテフロンシール33で挟み付けて、図2から導電性隔壁32のみを除いた形とすれば良い。二つのガラスキャピラリー31間はテフロンシール33により密着されており、漏れはない。

【0012】

【発明の効果】本実施例によれば、細胞等の微小領域へ*

*の試料の注入を電気泳動法を用いて行なうため、印加電圧及び電圧印加時間を制御することにより、極めて微量でも精度良く注入することができる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例にかかるマイクロインジェクション装置の構成を示すブロック図

【図2】本発明の実施例に使用しうるカセット式導電性隔壁の構成を示す断面図

【図3】電気泳動法の原理説明図

10 【図4】電気浸透流の原理説明図

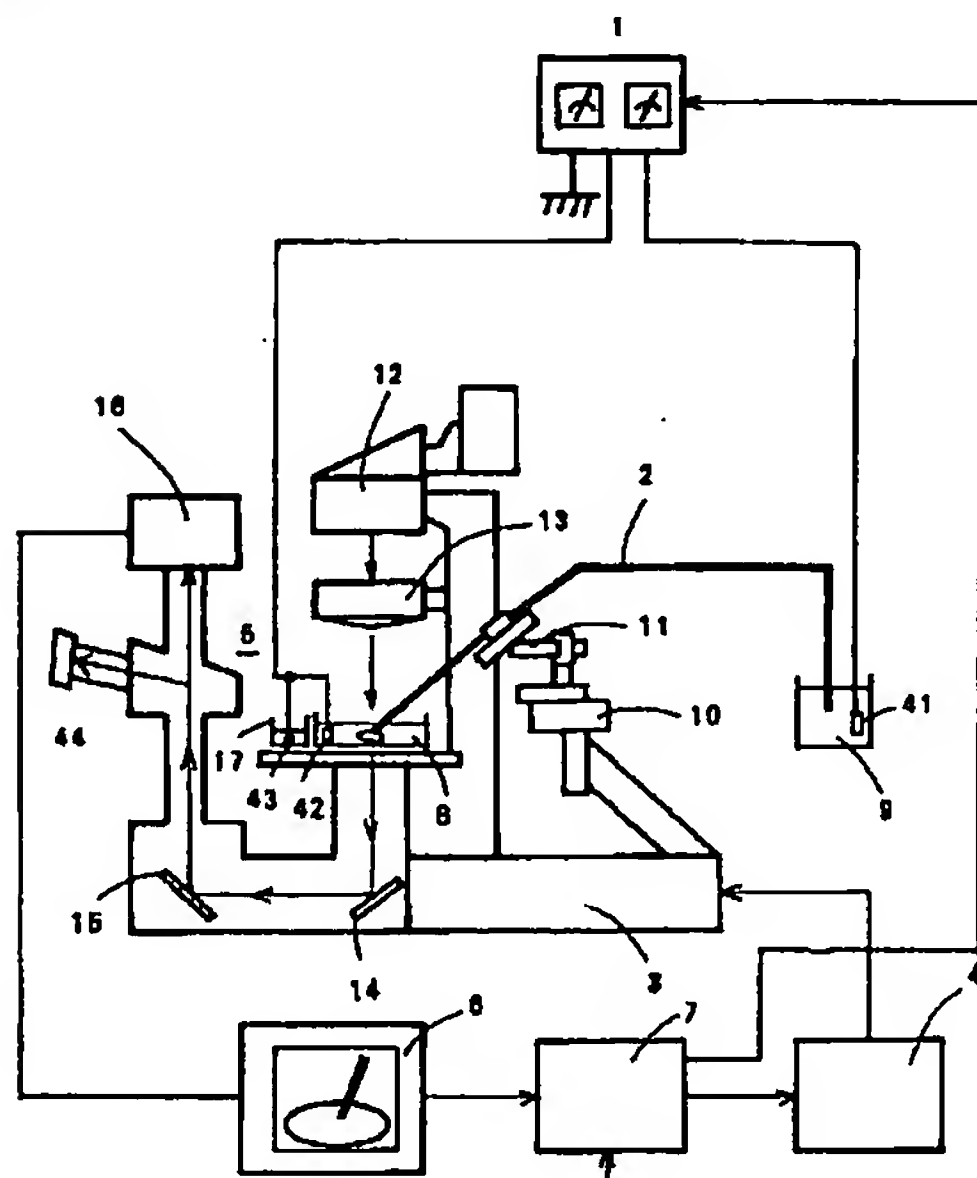
【図5】導電性隔壁の説明図

【符号の説明】

1…電源部、2…電気泳動部、3…駆動部、4…コントローラ部、5…顕微鏡部、6…テレビモニタ部、7…計算機部、8…試料槽、9…バッファ槽、10…粗動部、11…微動部、12…照明用の光源、13…コンデンサレンズ、14、15…反射ミラー、16…テレビカメラ、17…試料容器。

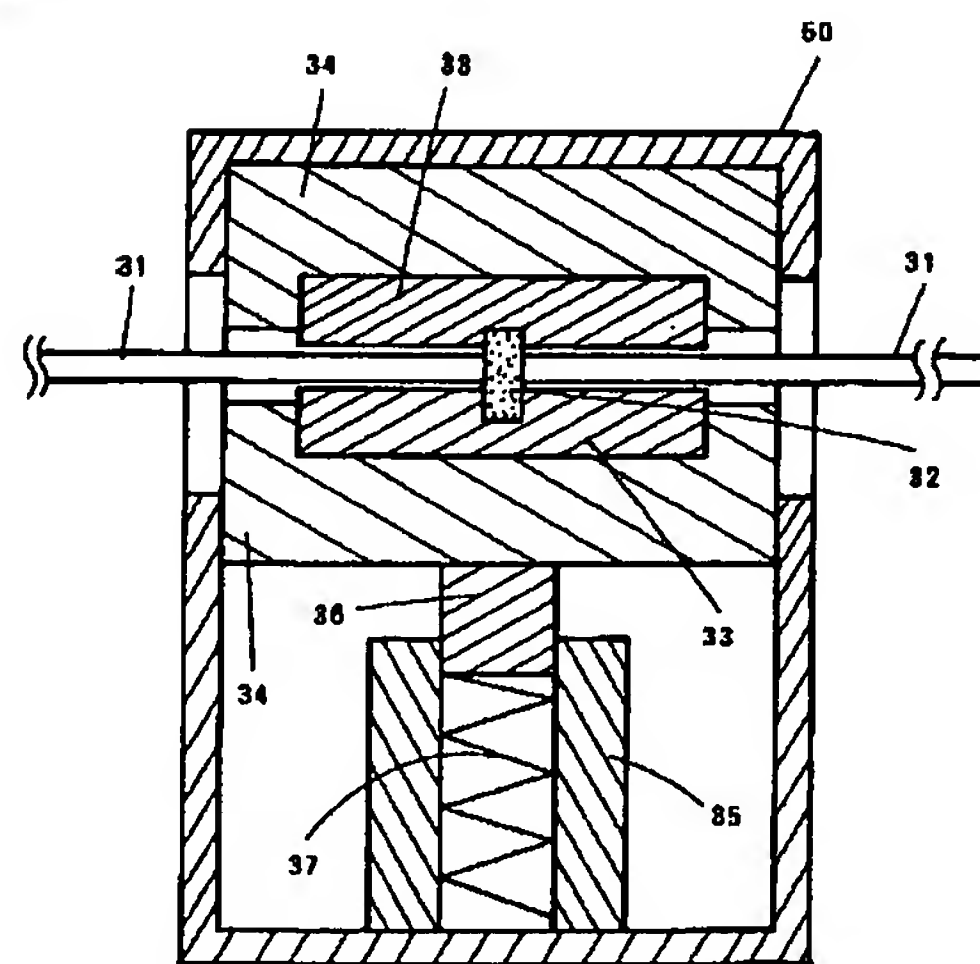
【図1】

図1



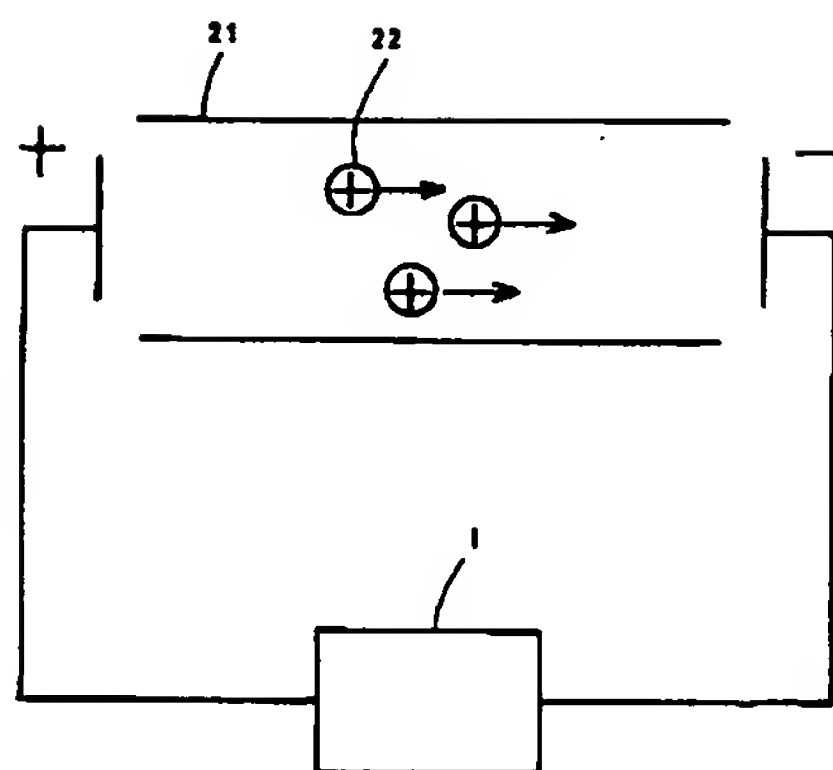
【図2】

図2



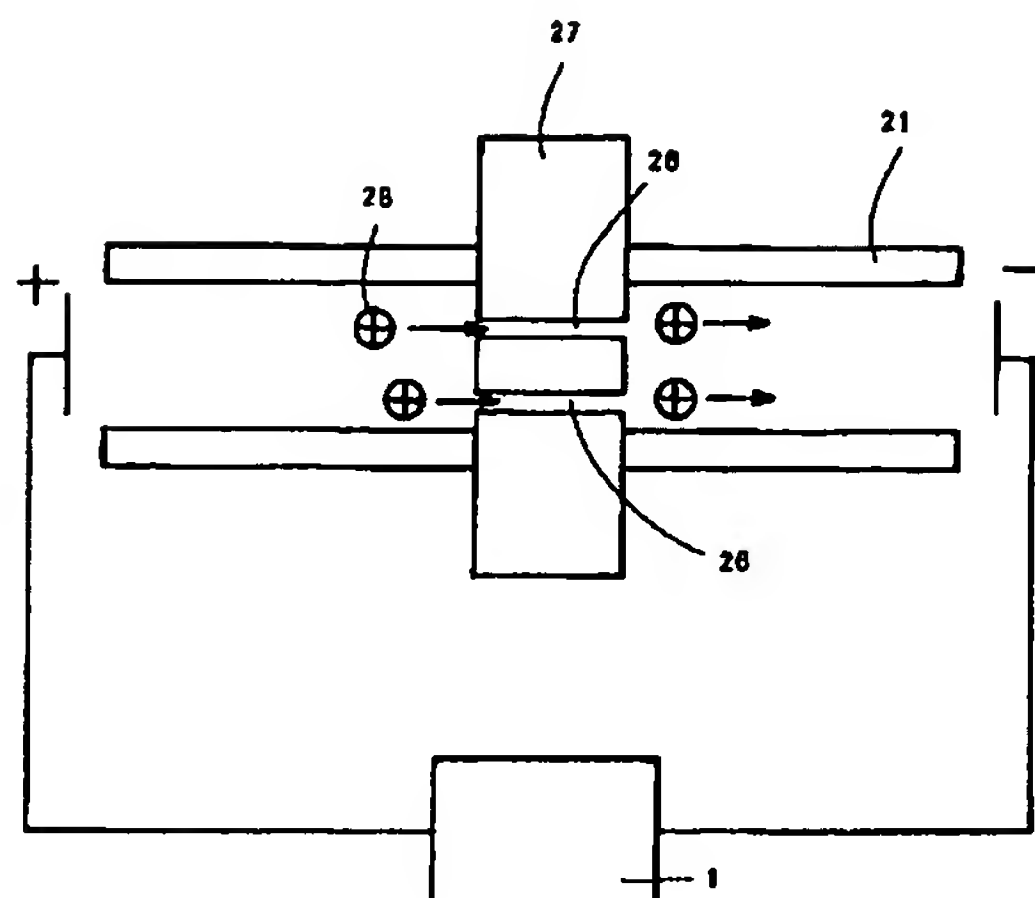
【図3】

図3



【図5】

図5



【図4】

図4

